抗体选择指南

抗体保存指南

抗体说明书样本

一 抗体选择指南

:检测任何目的靶蛋白都有不止一种抗体可供选择，为缩小抗体的选择范围选中合适的抗体，需要考虑如下几种因素：

1. 分析或应用的类型
2. 样本蛋白的结构性质
3. 样本的种属
4. 抗体宿主的种类
5. 抗体的标记和检测

1 分析试验的应用类型 一般抗体说明书都列出该抗体经试验验证过适用于何种分析类型，如：可以应用于 WB IHC ICC ELASA 分析等，如果抗体说明书没有提及的应用类型，并不意味着该抗体不适用于此种分析应用类型，而仅是说明尚未经过此种分析试验验证，如果抗体不适用某些分析试验，则会在抗体说明书上标注出来不适于某分析试验。

2 样本蛋白的结构性质 了解样本蛋白的结构性质有助于选择最合适的抗体，至少两方面因素需要考虑

(1)..待测样本蛋白的结构域：抗体是由各种不同免疫原免疫宿主而制备得来，其中的免疫原包括：全长蛋白、蛋白片断、多肽、全有机体（如：细菌）或细胞，抗体说明书一般都有免疫原的描述，如果打算检测的是蛋白片断或一种特殊的同型物或蛋白全长的某一区域，则必须选择用含此片段域的免疫原制备出的抗体。如果打算用 FACS 流式检测活细胞的表面蛋白，则需要选择含该表面蛋白的胞外域来免疫制备的抗体。

(2)样本的提取或处理过程：某些抗体要求样本经过某些特殊处理，例如：许多抗体只识别还原和变性的、表位已暴露不受二级四级结构阻碍的蛋白样本，另一方面，某些抗体仅识别天然折叠状态的蛋白。当选择免疫组化的抗体时，应注意某些抗体只识别未固定的冷冻的组织，而另一些抗体则适用于无需抗原修复解交联步聚的甲醛固定石蜡包埋的组织，这些都会在抗体说明书上应用部分标示出来

3 样本的物种 应选择物种相同或有交叉反应的抗体，抗体可能与不同物种的同种靶蛋白有交叉反应，因其氨基酸序列同源性较高，如果样本的种类未列入抗体说明书上的交叉反应种属表中，并不意味着该抗体不适用于检测该物种的蛋白，而只是表示该物种尚未用此抗体检测验证过，应通过序列比对的方法来预测交叉反应，可应用 Expasy 和 NCBI BLAST 来进行不同物种蛋白同源性比对。

4 一抗宿主物种的选择 一般说来，在使用偶联二抗结合无偶联物的一抗时，一抗宿主动物的

物种选择较为重要，对于免疫组化而言，尽可能选择与样本不同种系物种的一抗，从而避免二抗与样本内源性免疫球蛋白产生交叉反应，例如：检测小鼠样本蛋白，则不应选择小鼠或大鼠源的一抗，最好选兔源的一抗，则二抗则可选择偶联了检测分子（酶、荧光素、生物素等）的抗兔 IgG。如果选择有偶联物的一抗则不适用上述情况，除免疫组化外的其它对不含内源性免疫球蛋白样本的检测方法，则抗体宿主物种的影响不大，如对不含 IgG 的细胞裂解物样本的 western blotting 检测，尽管如此，含有血清的组织裂解物和组织培养上清中含有免疫球蛋白，还原变性样本中含 IgG，在 western blot 检测中则结合出现 IgG 分子 50 and 25 kDa 的重链和轻链条带。

5 二抗的选择　二抗应选用与使用的一抗相同的物种来源，例如：如果你的一抗是小鼠的单克隆抗体，二抗则选抗小鼠的二抗 anti-mouse secondary。建议检查二抗说明书确保该抗体适用于你的检测应用，　二抗一般连接荧光素 FITC 或发光团。

6 双重染色抗体的选择　用未偶联一抗进行细胞培养物或组织切片的双重免疫染色要求一抗来源于不同物种并且二抗分别识别其中之一，二抗说明书应描述其与其它物种来源的免疫球蛋有否有交叉吸附。

7 荧光和化学发光标记　连接于二抗的标记物是为了检测抗体的结合，选择标记物依赖于几个参数：检测方法：荧光或着色沉淀，荧光标记物用特殊波长的光激发时发射出可见光，下表列出了几种荧光素的分子特征：

荧光素	颜色	激发波	发射波长	分子量
Aminomethylcoumarin (AMCA)	Blue	353	440	410
Fluorescein (FITC)	Green	495	528	390
Fluorescein (DTAF)	Green	495	528	530
Rhodamine (TRITC)	Red	550	570	444
Texas Redtm	Red	596	620	625
Cy2tm	Green	489	505	897
Cy3tm	Orange	552	565	949
Cy3.5tm	Scarlet	581	596	1,286
Cy5tm	Far-Red	650	667	975
Cy5.5tm	Near Infra-Red	678	703	1,312
Cy7tm	Near Infra-Red	743	767	1,001
R-Phycoerythrin (RPE)	Red	488	575	240,000
B-Phycoerythrin (BPE)	Red	545	575	240,000
C-Phycocyanin	Red	618	640	110,000
R-Phycocyanin	Red	615	620	110,000

二抗连接标记酶 HRP and AP 与其底物产生有颜色的沉淀物

辣根过氧化物酶 **Horseradish peroxidase (HRP)**	碱性磷酸酶 **Alkaline phosphatase (AP)**
AEC (red)	Fast red (pink)
DAB (brown)	INT (yellow / brown)
	NBT (brown / purple)
	New Fuchsin (red)
	TNBT (purple)
	Vega red (pink)

封片介质（仅免疫组化）. AEC, Fast Red, INT 或其它水性发光基团是可以醇溶的并要求水性封片. 除上述之外的发光基团是有机的所以最好使用有机性封片介质。

荧光素标记物要求水性封片介质，藻红蛋白(藻青素 / 藻红素要求不添加甘油的水性封片介质，因其有淬灭荧光的效应，

生物素化的抗体通常用于加强亲和素-生物素-酶或荧光素复合物（ABC 试剂 或亲和素或链霉亲和素连接酶或荧光素的信号）

抗体保存指南

抗体保存得当与否，直接决定了抗体的活性和使用效果！如果抗体保存得当，大部分抗体活性都可以维持数月甚至数年。本指南以 abcam 抗体保存方法为主，同样也可以应用到其他绝大部分公司的抗体产品！

请谨记！无论何时**请按照说明书推荐的保存条件正确保存抗体！**

1. 收到抗体后**请务必在 12000rpm 离心 20-30s** 后再打开管盖进行分装和保存！

质优的抗体使用非常特殊的储存管，只有在 12000rpm 离心 20-30s 才能将附着在管壁或盖内的抗体全部离心下来。即使是在 10000rpm 离心也会导致离心不完全，导致出现抗体的量不足的现象！

- 2. 对于大部分抗体，比较合适的保存方式是**分装后保存在 -20 度 or -80** 度对绝大多数抗体来说，保存在-20 度是完全足够了。没有任何证据显示保存在-80 度 会有更多的好处！
- 分装可以最大程度的降低反复冻融对抗体活性的损害，同时也降低了由于多次从同一管中吸取抗体造成的污染可能性。
- 分装的量以一次实验用完为好，最少不能少于 10ul 每份。因为分装体积越小，抗体的浓度越可能会受到蒸发以及管壁吸附的影响
- 复融后的分装抗体如果一次用不完，将剩余母液保存在 4 度，避免再冻起来！
- 抗体工作液应该当天配制当天用完，在 4 度 尽量不要超过 1 天。
- 绝对避免将抗体保存在自动除霜冰箱中。尽量将抗体保存在冰箱里层，而不是门上

3. 大部分抗体收到后 4 度短暂保存 1-2 周对抗体活性是没有影响的。

如果抗体很快（1-2 周）会使用，推荐在 4 度保存，这是为了避免反复冻融对抗体活性的损害。如果要长期保存则最好是在-20 度 or -80 度。最关键的一点是要根据说明书推荐的方式来正确的保存抗体！

但是，腹水形式的产品请在收到后立即冻起来！因为该类产品含有大量的蛋白酶，长期在 4 度保存会导致抗体的降解！

4. 大部分抗体的运输条件：一般的运输过程需要 1-2 周的时间，所以是在 4 度的条件下来完成的。

4 度运输最主要的目的是为了避免反复冻融对抗体活性的损害（如果使用干冰运输，那么收到时抗体是冻起来的，为了分装就需要解冻。这就多了一次冻融的过程）。所以运输过程中绝对避免干冰运输！

特殊抗体的保存条件：

1. **酶联抗体**：永远保存在 4 度，避免冻起来。否则会导致酶活性的下降或者丧失

2. **偶联抗体**：所有偶联抗体都是在棕色管中或使用锡箔纸避光保存。尤其是荧光抗体，对光极为敏感，因此在所有的实验阶段也是要避光操作的！
3. **IgG3 的同型对照**：永远保存在 4 度，避免冻起来。因为如果出现冻融过程，该抗体非常容易形成多聚体

无论是保存还是运输，绝对避免反复冻融！

反复冻融会导致抗体变性，导致多聚体形成，从而降低抗体的结合能力！

抗体保存其它相关信息：

关于加入甘油保存：有些人会加 50%的甘油到抗体中来避免反复冻融，甘油在-20 度 会降低冰点。这对很多抗体可能是可行的。但是 abcam 仅对非常小的一部分抗体检测过其在这种条件下的稳定性；而 abcam 只对按照推荐条件保存的抗体提供质量保证！加入甘油的溶液不建议在-80 度保存，因为这已经超过了甘油的冰点。如果您要加入甘油来保存抗体的话，请谨慎注意无菌操作，避免污染！

关于蛋白保护剂：

蛋白在高浓度时更不容易降解（1 mg/ml 或者更高），这就是为什么在抗体中加入 BSA 之类作为稳定剂的原因了；另一方面，加入的蛋白也可以减少抗体由于管壁吸附所造成的损失。但是如果抗体要用来标记的话，则不能加入蛋白稳定剂，因为这些稳定剂会和抗体一起竞争结合标记物。

关于叠氮化钠（sodium azide）的使用：

为了防止微生物污染，叠氮化钠经常被加入到抗体中（终浓度 0.02% (w/v)）。Abcam 的很多抗体已经含有了 0.02%-0.05%的叠氮化钠，在说明书的“Storage buffer”中有标明的。

在下述情况中不能使用叠氮化钠：

- 如果抗体用于染色或处理活细胞，用于体内研究：

叠氮化钠在抵抗微生物的同时，对其它大部分有机物也是有毒的，因为它阻断了线粒体的 cytochrome electron transport system.

- 要偶联带有氨基基团的抗体：

叠氮化钠会干扰任何含有氨基基团的偶联，因此在进行偶联之前，应将叠氮化钠去除。偶联后的抗体可以加入叠氮化钠保存，但是浓度只能是 0.01%。对于需要偶联的抗体，thimerosal (merthiolate)可以替代叠氮化钠作为保护剂！

注：叠氮化钠的去除方式：

可以通过凝胶电泳或过滤的方式去除！IgG 的分子量是 150kDa（IgM 是~ 600kDa)；叠氮化钠的分子量只有 65Da。使用 cut off 14kDa 的滤膜即可将叠氮化钠从抗体中去除

抗体说明书样本

Product Name	NFkB p105 / p50 antibody [E381]　(注:E381 是指克隆号)
Product type	Primary antibodies
Description	Rabbit monoclonal [E381] to NFkB p105 / p50
Immunogen	A synthetic peptide corresponding to residues in the nuclear factor NFkB p50 subunit.
Reacts with	Hu, Ms, Rat (注:人　小鼠　大鼠)
Specificity	This antibody will detect both forms: p50 and p105.
Tested applications	Flow Cyt, ICC, IHC-P, WB(流式细胞分析　免疫细胞化学　免疫组织化学-石蜡包埋　western bloting)
Application notes	**Recommended dilutions** Flow Cyt: 1/30. ICC: 1/250 - 1/500. IHC-P: 1/250 - 1/500. WB: 1/5000. Detects bands of approximately 50 and 105 kDa (predicted molecular weight: 50 and 105 kDa). Is unsuitable for IP. Not yet tested in other applications. Optimal dilutions/concentrations should be determined by the end user.
Positive control	HeLa cell lysate; human prostate carcinoma
Cellular localization	Nuclear, but also found in the cytoplasm in an inactive form complexed to an inhibitor (I kappa B).
Research areas	Cancer >> Signal transduction >> Nuclear signaling >> NFkB pathway Chromatin >> Transcription >> Transcription Factors Nuclear Signaling >> Nuclear Signaling Pathways >> NFkB pathway Nuclear Signaling >> Transcription >> Other factors Cell Biology >> Signal Transduction >> Nuclear Signaling >> NFkB Pathway Immunology >> Innate Immunity >> Macrophage / Inflamm. Cell Biology >> Apoptosis >> Intracellular >> NFkB >> p50
Relevance	NFkB is a transcription regulator that is activated by various intra and extra cellular stimuli such as cytokines, oxidant free radicals, ultraviolet irradiation, and bacterial or viral products. NFkB is a family

of transcription factors that consists of homo and heterodimers of NFkB1/p50 and RelA/p65 subunits, and controls a variety of cellular events including development and immune responses. All members share a conserved amino terminus domain that includes dimerization, nuclear localization, and DNA binding regions, and a carboxy terminal transactivation domain. Serines 529 and 536 in the transactivation domain of RelA/p65 are phosphorylated in response to several stimuli including phorbol ester, IL1 alpha and TNF alpha as mediated by IkB kinase and p38 MAPK. Serine 529 is located in a negatively charged region (amino acids 422-540) that is phosphorylated in response to phorbol myristate acetate plus calcium ionophore activation. Phosphorylation of serines 529 and 536 is critical for RelA/p65 transcriptional activity. Activated NFkB translocates into the nucleus and stimulates the expression of genes involved in a wide variety of biological functions. Inappropriate activation of NFkB has been associated with a number of inflammatory diseases while persistent inhibition of NFkB leads to inappropriate immune cell development or delayed cell growth.

Alternative names for NFkB p105 / p50 antibody [E381] (ab32360)

Database links

The links below go to external sites and will open in a new browser window

Entrez Gene	4790 (Human) 18033 (Mouse) 81736 (Rat)	**SwissProt**	P19838 (Human) P25799 (Mouse) Q63369 (Rat)
GeneCard	GC04P103880 (Human)		
Omim	164011 (Human)	**Unigene**	431926 (Human)

Raised in Rabbit

Clonality Monoclonal

Clone number E381

Isotype IgG

Purity Protein A purified

Storage buffer Preservative: 0.01% Sodium Azide
Constituents: 40% Glycerol, 0.05% BSA, 0.15M Sodium chloride, 50mM Tris glycine. pH 7.4

Material safety datasheets (MSDS) for this product:

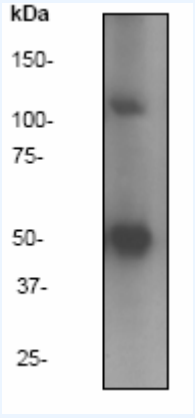
Form Liquid

Storage instructions Shipped at 4°C. Upon delivery aliquot and store at -20°C. Avoid freeze

/ thaw cycles.

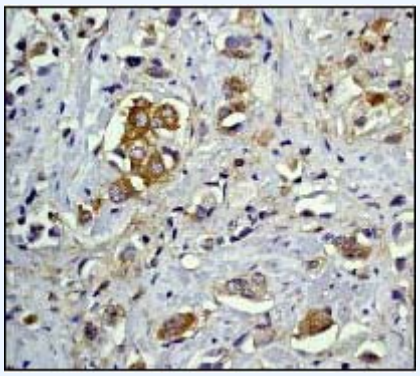
NFkB p105 / p50 antibody [E381] images:

Western blot - NFkB p105 / p50 antibody [E381] (ab32360)



NFkB p105 / p50 antibody [E381] (ab32360) at 1/5000 dilution + HeLa cell lysate
Predicted band size : 50 kDa
Observed band size : 50,105 kDa

Immunohistochemistry (Paraffin-embedded sections) - NFkB p105 / p50 antibody [E381] (ab32360)



Paraffin-embedded human prostate carcinoma
ab32360 at 1/250 dilution